дела ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко РАСХН.

Балбуцкая Анна Александровна – научный сотрудник Белгородского отдела ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко РАСХН.

Маханёв Виталий Владимирович - младший научный сотрудник Белгородского отдела ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко РАСХН.

Войтенко Андрей Владимирович - кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Белгородского отдела ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко РАСХН.

УДК 619:616.98:579.843.94

Чернышов А.В., Ручнова О.И., Прунтова О.В.
(ФГУ «ВНИИЗЖ»)

ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИЗОЛЯТОВ AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Ключевые слова: Avibacterium paragallinarum, Haemophilus paragallinarum, инфекционный ринит, биологические свойства.

Введение

Респираторные заболевания занимают одно из первых мест, среди инфекционной патологии птиц. К числу таких болезней относится в частности и инфекционный ринит, вызываемый бактериями вида Avibacterium paragallinarum, ранее известными как Haemophilus paragallinarum [3, 4, 7].

Инфекционный ринит - это высококонтагиозное заболевание цыплят и кур, характеризующееся катаральным воспалением слизистых оболочек носовой полости, конъюнктивы и воздухоносных пазух, а также подкожным отеком головы, в редких случаях пневмонией. Экономический ущерб наносится за счет отставания в росте цыплят (до 10-40%) и снижения яйценоскости кур [4, 5, 6, 8].

Мониторинговые исследования по инфекционному риниту в РФ не проводятся, а также отсутствуют нормативные документы по выделению данного возбудителя. Существует ряд условий, выполнение которых необходимо при выделении и культивировании A. paragallinarum. Поэтому исследования в этом направлении являются актуальными.

Целью данной работы явилось изучение морфологических, культуральных, биохимических свойств и чувствительности к антибактериальным препаратам изолятов A. paragallinarum.

Материалы и методы

Для исследования на наличие возбудителя инфекционного ринита, отбирали кусочки легких и смывы с трахеи и инфраорбитальных синусов от птиц различных возрастов, поступавших на исследование в период с 2009 по 2010 гг.

В данной работе использовали полевые изоляты A. paragallinarum «Бел-1», «С-1», «С-2», «Лен-1», «В-1», «В-2», а также референтный штамм Staphylococcus aureus №6538 из Американской коллекции типовых культур (АТСС).

Морфологию клеток определяли посредством световой микроскопии. Для этого использовали мазки культуры A. paragallinarum, выращенной на плотной питательной среде и окрашенные по Граму и по Бури [1]. Морфологические свойства колоний изучали при выращивании на плотных питательных средах, содержащих V- (экстракт пекарских дрожжей) и X- (экстракт эритроцитов крови лошади) факторы роста [2, 4, 7, 8].

Для изучения культуральных свойств бактерий A. paragallinarum производили посевы на следующие питательные среды: 1,5% агар на основе мясного гидролизата по Хоттингеру с добавлением 10% экстракта эритроцитов крови лошади, 10% экстракта пекарских дрожжей, 5% сыво-

ротки крови крупного рогатого скота I категории и 1% глюкозы (XF); 1,5% агар на основе мясного гидролизата по Хоттингеру с добавлением дефибринированной крови барана (КА); 1,5% агар на основе мясного гидролизата по Хоттингеру с добавлением 10% экстракта пекарских дрожжей (ХДЭ); 1,5% агар на основе мясного гидролизата по Хоттингеру с добавлением экстракта эритроцитов крови лошади (ХКЭ); 1,5% агар на основе мясного гидролизата по Хоттингеру (ХА); среду Эндо. Чашки с посевами инкубировали в термостате в течение 24-48 ч. при температуре 37 С.

Биохимические свойства изолятов исследовали при помощи бактериологического анализатора Vitek2 Compact (bioMerieux, Франция) с использованием карт NH (для идентификации прихотливых микроорганизмов) в соответствии с инструкцией по эксплуатации. Цитохромоксидазную активность определяли с помощью набора реактивов для оксидазного теста (ООО «Биокомпас-С», Россия). Продукцию каталазы определяли в тесте с 3% раствором перекиси водорода. Гемолитическую способность исследовали путем посева на КА [2]. Подвижность микроорганизмов определяли на полужидком агаре, с добавлением V-фактора роста, методом укола в агар (ПЖА) [2].

Чувствительность к антимикробным препаратам определяли диско-диффузионным методом с применением набора дисков, пропитанных различными антибиотиками (НИЦФ, г. Санкт-Петербург) по стандартной методике, в соответствии с МУК 4.2.1890-04. Степень резистентности изолятов определяли в соответствии с инструкцией прилагаемой к набору.

Результаты и обсуждение

За период с 2009 по 2010 гг. исследовано 166 проб патологического материала от цыплят-бройлеров и кур на инфекционный ринит. Всего выделено 17 изолятов A. paragallinarum от кур и цыплят-бройлеров. Из них: 3 изолята A. paragallinarum «В-1» выделено из смывов с трахеи кур 231-сут. возраста; 2 изолята «Лен-1» из смывов с инфраорбитальных синусов от кур, в возрасте около 50 сут.; 3 изолята «В-2» из смывов с инфраорбитальных синусов от кур, возраст 186 и 276 сут.; 2 изолята «С-1» из пораженных легких от кур, возраст 30 сут., 2 изолята «С-2» из смывов с инфраорбитальных синусов от кур, в возрасте 50 сут.; 5 изолятов «Бел-1» из смывов с инфраорбитальных синусов от цыплят-бройлеров, возраст 29 сут. Изоляты были выделены от птиц Нижегородской, Брянской, Пензенской областей и республики Татарстан.

Первичное выделение возбудителя инфекционного ринита проводили на XF или КА с культурой Staphylococcus aureus №6538 АТСС (в качестве баккормилки), ХА и среде Эндо.

Тинкториальные свойства изолятов, выращенных на плотной питательной среде (XF или КА), изучали в окраске по Граму, при этом наблюдали мелкие, короткие, овоидные, грамотрицательные палочки в сочетании с кокковидными формами. При окраске по Бури наличие капсулы не выявлено.

Морфологию колоний бактерий A. paragallinarum определяли при выращивании на чашках Петри с XF, которые инкубировали при 37^0С в течение 24-48 ч. Через 24 ч. наблюдали мелкие полупрозрачные, росинчатые, колонии, правильной округлой формы, с гладкой, блестящей поверхностью. При посеве культуры Staphylococcus aureus на чашку с наличием гемофильных микроорганизмов наблюдали выраженное усиление роста вблизи от кокковой культуры (сателлитный рост, «баккормилка»). Рост бактерий на ХА, среде Эндо, ХКЭ и ХДЭ отсутствовал. Таким образом, для роста выделенных изолятов требовалось наличие в питательной среде V- и F- факторов роста.

Результаты исследования биохимических свойств при помощи бактериологического анализатора Vitek2 Compact (bioMerieux, Франция) с использованием карт NH представлены в табл. 1.

В базе данных прибора отсутствовали сведения о данном микроорганизме, все изоляты были помечены как не идентифицированные. Определение принадлежности к виду A. paragallinarum проводили путем сопоставления полученных результатов с определителем Берджи и данными P.J. Blackall et al. [3, 7]

Все выделенные изоляты A. paragallinarum не обладали каталазной, гемолитической и цитохромоксидазной активностью. Подвижность изолятов в ПЖА и методе висячей капли, при использовании суточной культуры, не наблюдали.

Полученные нами результаты при исследовании культурально-морфологических и биохимических свойств согласовывались с данными зарубежных литературных источников [3, 4, 6, 7]. Все выделенные изоляты были отнесены к виду A. paragallinarum.

Результаты определения чувствитель-

Таблица 1

Биохимические свойства полевых изолятов *A. paragallinarum* при использовании бактериологического анализатора Vitek2 Compact

№ п/п	Биохимические показатели	Изоляты *A. paragallinarum*						По данным Берджи и P.J. Blackall
		В-1	Бел-1	С-1	С-2	Лен-1	В-2	
1	Аргининариламидаза	-	-	-	+	-	-	н/д
2	γ-глютамилтрансфераза	-	-	-	-	-	-	н/д
3	L-лизинариламидаза	-	-	-	+	-	-	н/д
4	D-галактоза	-	-	+	-	-	-	-
5	Лейцинариламидаза	+	+	+	+	+	+	н/д
6	Эллман	-	-	-	-	-	-	н/д
7	Фенилаланинариламидаза	+	+	+	+	+	+	н/д
8	L-пролинариламидаза	-	-	-	-	-	-	н/д
9	L-пирролидон-ариламидаза	-	-	-	-	-	-	н/д
10	Тирозинариламидаза	-	-	+	-	-	-	н/д
11	Ala-Phe-Pro-ариламидаза	-	-	-	-	-	-	н/д
12	D-глюкоза	+	+	+	-	-	+	+
13	Гликоген	-	-	+	-	-	-	н/д
14	D-манноза	+	+	+	+	+	+	+
15	D-мальтоза	-	-	+	-	-	-	+
16	сахароза	+	+	+	+	+	+	+
17	N-ацетил-D-глюкозамин	-	-	+	-	-	-	н/д
18	Уреаза	-	-	-	-	-	-	-
19	β-галактопиранозидаза (индоксил)	-	-	-	-	-	-	н/д
20	Орнитиндекарбоксилаза	-	-	-	-	-	-	-
21	α-арабинозидаза	-	-	-	-	-	-	н/д
22	Пируват	-	-	-	-	-	-	н/д
23	Фосфорилхолин	-	-	-	-	-	-	н/д
24	D-малат	-	-	-	-	-	-	н/д
25	Мальтотриоза	-	-	+	+	+	+	н/д
26	L-глютамин	-	-	-	-	-	-	н/д
27	Фосфотаза	+	-	-	-	-	-	+
28	D-рибоза 2	-	-	+	-	-	-	+
29	Фенилфосфонат	-	-	-	-	-	-	н/д
30	D-ксилоза	+	-	+	-	+	+	d

Примечание: « - » - отрицательная реакция; « + » - положительная реакция; «d» - 11-89% штаммов положительные; «н/д» - нет данных.

ности изолятов A. paragallinarum к антибактериальным препаратам представлены в табл. 2.

Установлено, что все изоляты A. paragallinarum резистентны к группе тетрациклинов (тетрациклин, доксициклин), к группе линкозамидов (клиндамицин), котримоксазолу (триметоприм), цефалоспоринам III поколения (цефиксим).

Изоляты A. paragallinarum «С-1», «С-2» чувствительны к цефалоспоринам II поколения (цефуроксим), природным пенициллинам (бензилпенициллин), полусинтетическим аминопенициллинам (ампициллин), группе левомицетина (левомицетин), цефалоспоринам III поколения (цефоперазону), ингибиторозащищенным пенициллинам (амоксициллин клавуланат), кроме того изолят «С-1» чувствителен к группе нитрофуранов (фурадонин), «С-1» и «С-2» обладают промежуточной чувствительностью к аминогликозидам II поколения (гентамицин), не чувствительны к остальным препаратам представленным в табл. 2.

Изолят «Бел-1» чувствителен к аминогликозидам II и III поколения (гентамицин, амикацин), группе левомицетина (левомицетин), группе нитрофуранов (фурадонин), обладает промежуточной чувствительностью к полусинтетическим аминопенициллинам (ампициллин), фторхинолонам II поколения (ципрофлоксацин, норфлоксацин), цефалоспоринам III поколения (цефоперазону) и нечувствителен к другим антимикробным препаратам.

Изолят «Лен-1» чувствителен к аминогликозидам II и III поколения (гентамицин,

Таблица 2

Чувствительность изолятов *A. paragallinarum* к антибактериальным препаратам

№ п/п	Наименование антибиотика	Зона подавления роста (мм), оценка зоны					
		Бел-1	С-1	С-2	Лен-1	В-1	В-2
1	Цефуроксим	13, R	31, S	25, S	19, I	30, S	15, R
2	Тетрациклин	10, R	10, R	12, R	0, R	8, R	0, R
3	Офлоксацин	11, R	0, R	0, R	11, R	24, S	16, S
4	Гентамицин	20, S	15, I	16, I	26, S	20, S	31, S
5	Бензилпенициллин	14, R	30, S	27, S	0, R	17, R	10, R
6	Ампициллин	20, I	30, S	30, S	16, R	18, R	0, R
7	Цефиксим	10, R	0, R	0, R	15, R	0, R	8, R
8	Ципрофлоксацин	16, R	0, R	0, R	19, I	20, I	25, S
9	Доксициклин	0, R	0, R	0, R	0, R	8, R	10, R
10	Амоксиклав	21, S	26, S	23, S	27, S	31, S	19, R
11	Норфлоксацин	14, I	0, R	0, R	10, R	20, S	23, S
12	Клиндамицин	10, R	0, R	10, R	11, R	0, R	12, R
13	Фурадонин	35, S	22, S	17, I	35, S	30, S	17, I
14	Левомицетин	22, S	27, S	30, S	18, I	13, R	20, S
15	Триметоприм	0, R	0, R	15, R	8, R	0, R	0, R
16	Цефоперазон	17, I	25, S	24, S	32, S	17, I	30, S
17	Эритромицин	0, R	0, R	0, R	21, S	18, I	0, R
18	Тикарциллина клавуланат	-	-	-	10, R	34, S	0, R
19	Меропенем	-	-	-	35, S	30, S	11, R
20	Амикацин	21, S	12, R	9, R	26, S	20, S	25, S
21	Левофлоксацин	11, R	0, R	0, R	15, I	30, S	22, S

Примечание: R – резистентные, S – чувствительные, I – промежуточная чувствительность.

амикацин), группе нитрофуранов (фурадонин), цефалоспоринам III поколения (цефоперазону), группе карбопенемов (меропенем), 14-членным природным макролидам (эритромицин), обладает промежуточной чувствительностью к цефалоспоринам II поколения (цефуроксим), фторхинолонам II поколения (ципрофлоксацин), группе левомицетина (левомицетин), фторхинолонам III поколения (левофлоксацин) и нечувствителен к другим исследованным препаратам.

Изоляты «В-1» и «В-2» чувствительны к аминогликозидам II и III поколения (гентамицин, амикацин), фторхинолонам II и III поколения (офлоксацин, норфлоксацин, левофлоксацин). Кроме того, изолят «В-1» чувствителен к группе карбопенемов (меропенем), ингибиторозащищенным пенициллинам (тикарциллин клавуланат, амоксициллин клавуланат), группе нитрофуранов (фурадонин), цефалоспоринам II поколения (цефуроксим) и обладает промежуточной чувствительностью к фторхинолонам II поколения (ципрофлоксацин), цефалоспоринам III поколения (цефоперазону), 14-членным природным макролидам (эритромицин). В то время как, изолят «В-2» чувствителен к фторхинолонам II поколения (ципрофлоксацин), группе левомицетина (левомицетин), цефалоспоринам III поколения (цефоперазону) и обладает промежуточной чувствительностью в отношении группы нитрофуранов (фурадонин).

Выводы

1. Выделенные изоляты имеют общие характерные тинкториальные, культурально-морфологические, биохимические свойства характерные для вида A. paragallinarum.

2. Для выделения и культивирования A. paragallinarum необходимо наличие в питательной среде V- и X- факторов роста.

3. Процент выделения возбудителя инфекционного ринита из смывов с инфраорбитальных синусов (70,6%) выше, чем при исследовании проб из других отделов дыхательных путей, таких как трахеи (17,6%) и легких (11,8%).

4. Изоляты A. paragallinarum обладают широким спектром резистентности к антимикробным препаратам, в частности, все они были резистентны к группе тетрациклинов, линкозамидов, ко-тримоксазолу и цефалоспоринам III поколения.

Резюме: В статье представлены результаты исследования патологического материала от больных и павших птиц хозяйств Российской Федерации на наличие бактерий Avibacterium paragallinarum, в период с 2009 по 2010 гг. Представлены результаты изучения морфологиче-

ских, культуральных и биохимических свойств выделенных изолятов. Рассмотрена их чувствительность к антибактериальным препаратам.

SUMMARY

Results of examination of pathological material from diseased and dead poultry in holdings of the Russian Federation for the presence of bacterium Avibacterium paragallinarium during 2009-2010 are presented in the paper. Results of studying morphological, cultural and biochemical properties of the recovered isolates are provided. Their sensitivity to some antibacterial preparation was reviewed.

Keywords: Avibacterium paragallinarum, Haemophilus paragallinarum, infectious rhinitis, biological properties.

Литература

1. Методы общей микробиологии: в 3-х т. Т.1 / Ф. Герхардт, Р.Г. Мюррей, Р.Н. Костилов [и др.]. – М.: Мир, 1983. – 536 с.
2. Методы общей микробиологии: в 3-х т. Т.3 / Ф. Герхардт, Р.Г. Мюррей, Р.Н. Костилов [и др.]. – М.: Мир, 1983. – 264 с.
3. Bergey's manual of systematic bacteriology. – 2nd ed. Vol. 2. The Proteobacteria. Part A / ed. G.M. Garrity [et al.]; Bergey's Manual Trust Department of Microbiology and Molecular Genetics Michigan State University, 2005. – 1136 p.
4. Blackall P. J. Infectious Coryza: Overview of the disease and new diagnostic options // Clinical Microbiology Reviews. – 1999. – Vol. 12, №4. – P. 627–632.
5. Evaluation of two experimental infection models for Avibacterium paragallinarum / Q. Zhao, Y. Sun, X. Zhang [et al.] // Vet. Microbiology. – 2010. – Vol. 141. – P. 68–72.
6. Jordan F.T.W., Pattison M. Poultry Disease. – 4th ed. – Great Britain: W.B. Saunders Company Ltd., 1996. – 546 p.
7. Reclassification of Pasteurella gallinarum, [Haemophilus] paragallinarum, Pasteurella avium and Pasteurella volantium as Avibacterium gallinarum gen. nov., comb. nov., Avibacterium paragallinarum comb. nov., Avibacterium avium comb. nov. and Avibacterium volantium comb. nov. / P.J. Blackall, H. Christensen, T. Beckenham [et al.] // Intern. J. of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2005. – Vol. 55. – P. 353–362.
8. Vargas E.S., Terzolo H.R. Haemophilus paragallinarum: Etiology of infectious coryza // Vet. Mex. – 2004. – Vol. 35, №3. – P. 245–259.

Контактная информации об авторах для переписки

А.В. Чернышов, ведущий ветеринарный врач, лаборатория бешенства и прионных инфекций ФГУ «ВНИИЗЖ»; e-mail: chernishov@arriah.ru

О.И. Ручнова, кандидат ветеринарных наук, заведующая лабораторией микробиологии кормов и продуктов питания ФГУ «ВНИИЗЖ»; e-mail: ruchnova@arriah.ru

О.В. Прунтова, доктор биологических наук, профессор, заведующая отделом мониторинга пищевой безопасности ФГУ «ВНИИЗЖ»; e-mail: pruntova@arriah.ru

УДК: 619:616.995.429.1

Березина Е.С., Лобкис Д.В., Старостина О.Ю.

(Омский государственный педагогический университет, Омский Научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора)

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ТОКСОПЛАЗМОЗА В ПОПУЛЯЦИЯХ ДОМАШНИХ И СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Ключевые слова: токсоплазмоз, экстенсивность инвазии, распространение токсоплазмоза, серопозитивные реакции, заболеваемость людей

Сокращения: ЭИ – экстенсивность инвазии, СП – серопозитивность, КРС – крупный рогатый скот, МРС – мелкий рогатый скот, ИФА – иммуноферментный анализ, РФА – реакция флуоресцирующих антител, РСК – реакция связывания комплемента, РНГА – реакция непрямой гемагглютинации

Введение

Токсоплазмоз – широко распространенная инвазия, вызываемая простейшим